

# 美国白蛾核型多角体病毒 *p35* 基因的克隆及序列分析

曹广力, 薛仁宇, 朱越雄, 魏育红, 贡成良\*

(苏州大学生命科学学院, 苏州 215006)

**摘要:** 对美国白蛾核型多角体病毒 (HycuNPV, *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus) *p35* 基因的序列分析表明: HycuNPV *p35* 编码序列 900 bp, 编码 299 氨基酸。同源性分析表明: HycuNPV *p35* 与 BomoNPV T3、AucaNPV、SpliNPV、LeseNPV、HearNPV 在核苷酸水平上为 99.9%、95.7%、93.6%、80.2% 和 87.2%, 在氨基酸水平上为 99.7%、90.3%、77%、64.9% 和 73.2%, 显示了杆状病毒 *p35* 基因在进化上的保守性。BomoNPV T3 中位的 H<sup>122</sup>, 在 HycuNPV 中被 R 取代。推测 HycuNPV *p35* 蛋白的功能及抑制细胞凋亡的能力与 BomoNPV T3 *p35* 蛋白的相似。

**关键词:** 美国白蛾核型多角体病毒; *p35* 基因; 核苷酸序列

中图分类号: Q965.8; Q75 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296 (2002) 06-0711-06

## Cloning and nucleotide sequence analysis of the *p35* gene of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus

CAO Guang-Li, XUE Ren-Yu, ZHU Yue-Xiong, WEI Yu-Hong, GONG Cheng-Liang\* (Life Science College of Suzhou University, Suzhou 215006, China)

**Abstract:** Sequence analysis of the *p35* gene of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus (HycuNPV) showed that the HycuNPV *p35* gene was 900 bp and encoded 299 amino acids. Compared with BomoNPV T3, AucaNPV, SpliNPV, LeseNPV and HearNPV, nucleotide and amino acid identity were 99.9%, 95.7%, 93.6%, 80.2%, 87.2% and 99.7%, 90.3%, 77%, 64.9%, 73.2% respectively, and showed evolutionary conservation. H<sup>122</sup> of BomoNPV T3 *p35* was replaced by R in HycuNPV *p35*. It is possible that the function and anti-apoptotic action of HycuNPV *p35* is similar to that of BomoNPV T3 *p35*.

**Key words:** *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus; *p35* gene; nucleotide sequence

核型多角体病毒 (nucleopolyhedrovirus, NPV) 属杆状病毒科成员, 病毒粒子具有囊膜, 病毒核酸为环状双链 DNA。目前 NPV 已发展成为一种比较成熟的真核基因表达载体, 在细胞、昆虫中表达了数百种外源基因。细胞凋亡 (apoptosis) 是多细胞有机体为调控机体发育, 维护内环境稳定, 由基因控制的细胞主动死亡过程, 在多种生物学过程中都有发现, 杆状病毒基因组中也存在有细胞凋亡基因, 如 *p35* 基因和 *iap* 基因。当用缺失 *p35* 基因的苜蓿银纹夜蛾 NPV (AucaNPV, *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus) 感染 SF-21 细胞时, 就可以观察到明显的细胞凋亡现象 (Clem *et al.*, 1991)。对 AucaNPV 的 *p35* 基因序列分析表明: 该基因翻译起

始位点上游同时具有杆状病毒早期启动子、晚期启动子的基序, 编码 35 kD 蛋白, 其功能与编码细胞凋亡抑制蛋白的 *iap* 基因相似 (Crook *et al.*, 1993), 能抑制病毒感染所诱导的细胞凋亡, 为负相调节基因。*p35* 基因及其在不同昆虫细胞中的功能可能是多样的。家蚕核型多角体病毒 T3 株 (BomoNPV T3, *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus T3 strain) 也具有 *p35* 基因, 也能在阻止 BmN 细胞凋亡中起作用, 但当用 *p35* 基因缺失的 BomoNPV 突变系感染时, 部分细胞发生了凋亡, 而另一些细胞则能充分支持病毒的复制 (Kamita *et al.*, 1993)。为了进一步研究 *p35* 基因的变异及功能, 我们对美国白蛾核型多角体病毒 (*Hyphantria cunea* nucleopoly-

作者简介: 曹广力, 男, 1964 年 3 月生, 副教授, 主要从事分子生物学研究, E-mail: guanglicao@sina.com

\* 通讯作者 Author for correspondence

收稿日期 Received: 2001-09-03; 接受日期 Accepted: 2002-01-15

hedrovirus, HycuNPV) 的 *p35* 基因进行了克隆及序列分析, 并与其它 NPV *p35* 基因进行了比较。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株、病毒、质粒

SPIM 细胞、HycuNPV 由日本三重大学分子生物工实验室提供, 本实验室保存; *E. coli* 的 TC<sub>7</sub> 菌株、测序质粒载体 pBluescript II SK (+) (Amp<sup>r</sup>) 由中国科学院上海生物化学研究所提供, 本实验室保存。

### 1.2 试剂

T<sub>4</sub> DNA 连接酶、限制性内切酶及其它试剂购于 GIBCO BRL 公司, 高保真 Taq 酶购于上海生工生物技术有限公司。

### 1.3 引物设计

根据 BomoNPV T3 株 *p35* 序列 (Kamita *et al.*, 1993), 通过计算机辅助设计一对引物, 由上海生工生物技术有限公司合成。引物分别为:

P35-1: 5'-CAGGATCCATGTGTGTAATTTTCC-3'

P35-2: 5'-AATCTAGACATCTCAAATCTTGGC-3'

### 1.4 病毒 DNA 的制备

收集病毒感染的 SPIM 细胞培养液, 8 000 r/min 离心 10 min, 上清液用 SW-27 转子 24 000 r/min 超离 30 min; 将沉淀的病毒粒子悬于 1 mL 的 TE (pH 8.0) 中, 加蛋白酶 K 至终浓度为 50 μg/mL, 50℃ 水浴 2 h; 再加 Sarcosyl 至终浓度为 1%, 50℃ 水浴 2 h; 用等体积过饱和酚、氯仿/异戊醇 (24:1) 各抽提一次, 12 000 r/min 离心 5 min, 上清加入 2.5 倍体积的 95% 冷乙醇, DNA 呈絮状沉淀, 用玻璃棒搅出, 70% 的乙醇洗涤一次, 自然蒸发残余乙醇, 溶于适量 TE 中; 电泳检查, 4℃ 放置待用。

### 1.5 克隆与测序

用 HycuNPV DNA 作为模板, 进行 PCR 体外扩增。PCR 扩增条件为: 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 共 30 个循环。PCR 产物经低熔点琼脂糖回收后, 用 *Bam*H I、*Xba*I 双酶切, 克隆进 pBluescript II SK (+) 的 *Bam*H I、*Xba*I 位点, 经 *Sal*I、*Bam*H I、*Xba*I 等酶切鉴定后, 由上海生工生物技术有限公司双向自动测序。克隆策略见图 1。

### 1.6 同源性分析

应用 PC/gene (ver 6.8 Intelli Genetics) Clustal 程序进行。

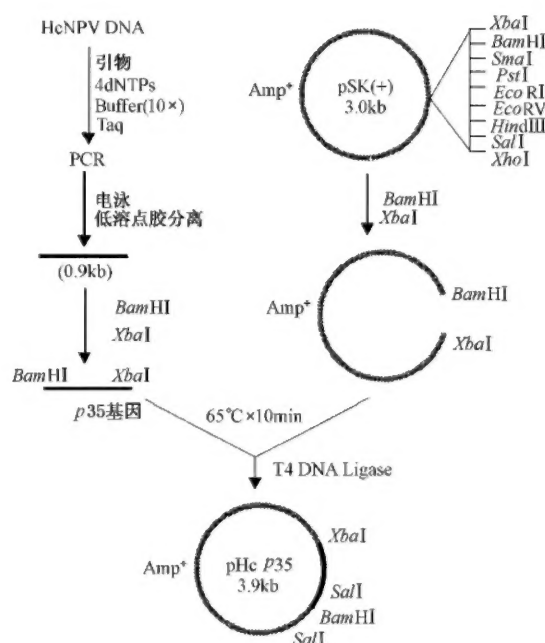


图 1 克隆策略

Fig. 1 Construction of clon vector

## 2 结果和分析

### 2.1 HycuNPV 基因的核苷酸序列

PCR 产物经低熔点琼脂糖回收后, 克隆进 pBluescript II SK (+) 的 *Bam*H I、*Xba*I 位点, 经 *Sal*I、*Bam*H I + *Xba*I、*Sal*I + *Xba*I 等酶切鉴定 (图 2) 后, 由上海生工生物技术有限公司自动测序。

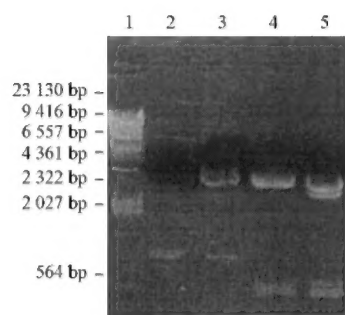


图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction detection of recombinant vector

1: 标准 mark; λDNA/HindIII; 2: PCR 产物 the purified PCR products;

3: *Bam*H I + *Xba*I; 4: *Sal*I; 5: *Sal*I + *Xba*I

HycuNPV *p35* 基因的核苷酸序列如图 3 所示。HycuNPV *p35* 基因编码序列为 900 bp, 编码 299 氨

ATGTGTGTAATTTTCCGGTAGAAATCGACGTGTCCAGACGGTTATTCGAGATTGTCATGTGGACGAACAAACCAGAGAGTTGGTGTAC 90  
 M C V I F P V E I D V S Q T V I R D C H V D E Q T R E L V Y 30  
 ATTAACAAGATTATGAACACGAATTGACAAAACCGTTCTCATGATGTTTAACATTTCCGGTCTATACGAAGCGTTACGCGCAAGAAC 180  
 I N K I M N T Q I T K P V L M M F N I S G P I R S V T R K N 60  
 AACGATTTCGCGCAGACAATAAATCAAAGTCGATGAACAATTTGATCAACTAGAACGCGAATACAGCGATAAAATTGATGGATTTCAC 270  
 N D L R D R I K S K V D E Q F D Q L E R E Y S D K I D G F H 90  
 GATAACATCCAGTATTTAAAGATGAACACTATTCGGTAAGTTGCCAAAATGGCAGCGTGTGAAAAGCAAGTTTGCTAAAATTTAAAA 360  
 D N I Q Y F K D E H Y S V S C Q N G S V L K S K F A K I L K 120  
 AGTCGTGGATTATACCGATAAAAGTCTATTGAAACTTACGAAAATACTGTTTGCCCAATTGGTGACAAAACACACGACTGCTACGTC 150  
 S G D Y T D K K S I E T Y E K Y C L P Q L V D K H N D C Y V 150  
 GCGGTATGCGTGTGAAGCCGGGATTGAGAACGCGAGCAACCAAGTCTATCTTTGAGTACAACCCGATTGGTAACAAAGTTATTGTG 540  
 A V C V L K P G F E N G S N Q V L S F E Y N P I G N K V I V 180  
 CCGTTTGCTCAGAAATTAACGACACGGGACTTTACGAGTACGACGCTCTAGCTTACGTGGACAGTGTGGAGTTTGATGGCAACAATTT 630  
 P F A H E I N D T G L Y E Y D V L A Y V D S V E F D G K Q F 210  
 GAAGAGTTGTACAAAAATTAATATTGCCGTCGTCCTCAACGATTCCGAAAAGGTTTATATTACAACGAAGCGTCGAAAAACAAAAAC 720  
 E E F V Q K L I L P S S F N D S E K V L Y Y N E A S K N K N 240  
 ATGATCTACAAGGCTTTGGAGTTTACTACAGAATCGAGCTGGGTCAAATCCAACAAGTTTAATTGGAAAATTTTTGTAAACGGTTTTATT 810  
 M I Y K A L E F T T E S S W V K S N K F N W K I F C N G F I 270  
 TATGATAAAAAATCAAAGCGTTGTATGTTAAATTGACAAATGTAAGTACTCAACAAAATGTAATATTAGACATGATTAATAAA 900  
 Y D K K S K A L Y V K L H N V T S T L N K N V I L D M I K 299  
 ATGTTAAAATTTATTGCTAATAATTATTCTTTGTCAITGCTTGATCGTGTTTACGAATATAATTCTACTCGTAACGCAAGATTGAGATG 991

图3 HycuNPV *p35* 基因的核苷酸序列以及推测的氨基酸序列

Fig. 3 HycuNPV *p35* nuclear acid sequence and its predicted amino acid sequence

下划线表示以 BomoNPV T3 的 *p35* 基因设计的引物序列

Primer sequence underlined was designed for BomoNPV T3 *p35*

氨基酸，与 BomoNPV T3 (Kamita *et al.*, 1993)、AucaNPV (Clem *et al.*, 1991)、HearNPV (*Heliothis armigera* nucleopolyhedrovirus, 棉铃虫 NPV, GenBank 登记号为 AF063105) 一样，比 SpliNPV (*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, 斜纹夜蛾 NPV, GenBank 登记号为 Y10254) 的 *p35* 基因多 9 bp，即多 3 个氨基酸残基，比 LeseNPV (*Leucania separata* nucleopolyhedrovirus, 粘虫 NPV, GenBank 登记号为 AF068929) 的 *p35* 基因少 9 bp，即少 3 个氨基酸残基。

## 2.2 同源性分析

应用 PC/gene (ver 6.8 Intelli Genetics) Clustal 程序对 HycuNPV、BomoNPV T3、AucaNPV、SpliNPV、LeseNPV、HearNPV 的 *p35* 基因进行同源性分析，结果如图 4 和图 5 所示。HycuNPV *p35* 与 BomoNPV T3、AucaNPV、SpliNPV、LeseNPV、HearNPV 在核苷酸水平上同源性分别为 99.9%、95.7%、

93.6%、80.2%和 87.2%，在氨基酸水平上的同源性分别为 99.7%、90.3%、77%、64.9% 和 73.2%，表现出杆状病毒 *p35* 基因在进化上的保守性。HycuNPV 与 BomoNPV 为不同病毒，在核苷酸水平、氨基酸水平都表现出很高的同源性。应用 Chou-Fasman 和 GOR 法分析表明，杆状病毒的 *p35* 不仅在一级结构上同源性较高，而且在二级结构上也呈非常好的保守性。

对已知的一些杆状病毒的 *p35* 基因进行对比进化分析发现，HycuNPV 与 BomoNPV 处于同一分枝，这与来自于 HycuNPV 的其它基因的进化分析结果一致(曹广力等, 2001; 贡成良等, 1998, 1999)。从分子水平研究杆状病毒的进化机制是杆状病毒研究的一个重要内容，NPV *p35* 基因是一个比较保守的基因，我们用 *p35* 基因比较了几种杆状病毒的亲缘关系，与 NPV 的多角体蛋白基因 (*ocu*) 等基因在进化树中遗传关系上一致。

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| HC    | ATGTGTGTAATTTTTC CGGTAGAAAATCGACGTGTCCAGACGGTTATTTCAGATATGTCATGTGGACGAACAAACCAGAGAGTT    | 83  |
| T3    | ATGTGTGTAATTTTTC -CGGTAGAAAATCGACGTGTCCAGACGGTTATTTCAGATATGTCATGTGGACGAACAAACCAGAGAGTT   | 83  |
| AC    | ATGTGTGTAATTTTTC CGGTAGAAAATCGACGTGTCCAGACGGTTATTTCAGATATGTCATGTGGACGAACAAACCAGAGAGTT    | 83  |
| HA    | ATGTGTGTAATTTTTC -CGGTAGATTTTCGACGTGTCCAGACGGTTATTTCAGATATGTCAGGTGGACGAACAAACCAGAGAGTT   | 83  |
| SL    | ATGTGTGTAATTTTTCGCGGTAGAAAATCGACGTGTCC -AGACGATTAT CGAGATTGTGAGGTGGACGA -CAA -CCAGAGAGTT | 80  |
| LS    | ATGTGTGTAATTTTTC -CGGTAGAAATCCATCTATCCCAACCGATTATTTCAGATATGTCAGGTGGACGAACAAACCAGAGAGTT   | 83  |
| ***** |  |     |
| HC    | GGTGTACATTAAACAGATTATGAACACGCAATTGACAAAACCCGTTCTCATGATGTTTAACATTTCGGGTCCCTATACGAAGCGT    | 167 |
| T3    | GGTGTACATTAAACAGATATGAACACGCAATTGACAAAACCCGTTCTCATGATGTTTAACATTTCGGGTCCCTATACGAAGCGT     | 167 |
| AC    | GGTGTACATTAAACAGATTATGAACACGCAATTGACAAAACCCGTTCTCATGATGTTTAACATTTCGGGTCCCTATACGAAGCGT    | 167 |
| HA    | GGTGTACATTAAACAGATTATGAACACGCAATTGACAAAACCCGTTCTCATGATGTTTAACATTTCGGGTCCCTATACGAAGCGT    | 167 |
| SL    | G-TGTACAT ACAGA TATGAAC CACAATTGACAAAACCCGTTCTCATGATGTTTAACATTTCGGGTCCCTATACGAAGCGT      | 158 |
| LS    | GGTGTACATTAAACAGACCACGAACACGCAACCGCAAAAACCCGTTCTCAGCATGTTTAACATTTCGGGTCCCTATACGAAGCGA    | 167 |
| ***** |  |     |
| HC    | TACCGCAAGAACCAAGATTTCGCGGACAGAATAAAAATCAAAGTCGATGAACAATTTGATCAAC-TAGAACCGCAATACACGG      | 250 |
| T3    | TACCGCAAGAACCAAGATTTCGCGGACAGAATAAAAATCAAAGTCGATGAACAATTTGATCAAC-TAGAACCGCAATACACGG      | 250 |
| AC    | TACCGCAAGAACCAACAAATTTCGCGGACAGAATAAAAATCAAAGTCGATGAACAATTTGATCAAC-TAGAACCGCAATACACGG    | 250 |
| HA    | TACCGCAAGAACCAACAAATTTCGCGGACAGAATAAAAATCAAAGTCGATGAACAATTTGATCAAC-TAGAACCGCAATACACGG    | 250 |
| SL    | TACCGCAAGAACCAACAAATTTCGCGGACAGAATAAAAATCAAAGTCGATGAACAATTT GATCAACCTGAAACCGGATTACACGG   | 241 |
| LS    | AACCGCAAGAACCAAGTTTAAGCGGACAGAATAAAAATCAAAGAACCAACAAATTTGATCCCG-TACAAACCGGATTTCGACGG     | 250 |
| ***** |  |     |
| HC    | ATAAAATGATGGATTTCACGATAACATCCAGTATTTTAAAGATGAACACTATTCGGTAAGTTGCCAAAATGCGACGCTGTTGA      | 334 |
| T3    | ATAAAATGATGGATTTCACGATAACATCCAGTATTTTAAAGATGAACACTATTCGGTAAGTTGCCAAAATGCGACGCTGTTGA      | 334 |
| AC    | ATCAAAATGGATGGATTTCACGATAACATCCAGTATTTTAAAGATGAACACTATTCGGTAAGTTGCCAAAATGCGACGCTGTTGA    | 334 |
| HA    | ATCAATTTGGTGGATTTCAGATTAGCATCAAGTATTTTCAAGATGCCAATATTTGGGAAATTTGCCAAATTTGGCAGCTGTTGA     | 334 |
| SL    | ATCAAAATGGATGGATTTCACGATAGCATCAAGTATTTTAAAGATGAACACTATTCGGTAAGTTGCCAAAATGCGACGCTGTTGA    | 325 |
| LS    | ATCAAAATGGGATTTCACCATATCAAGTATTTTGGGATGAACACTATTCGGTACGTTGCCAAAACCGGACGCTGTTGA           | 334 |
| ***** |  |     |
| HC    | AAAGCAAGTTTGCTAAAATTTTAAAGATCGTGATTATACCGATAAAAAGTCTATTGAAA CTTAC-GAAAAATACTGTTTGGC      | 416 |
| T3    | AAAGCAAGTTTGCTAAAATTTTAAAGATCGTGATTATACCGATAAAAAGTCTATTGAAA CTTAC-GAAAAATACTGTTTGGC      | 416 |
| AC    | AAAGCAAGTTTGCTAAAATTTTAAAGATCGTGATTATACCGATAAAAAGTCTATTGAAA CTTAC-GAAAAATACTGTTTGGC      | 416 |
| HA    | AAAGCAAGTTTGCTAAAATTTTAAAGATCGTGATTATACCGATAAAAAGTCTATTGAAA CTTAC-GAAAAATACTGTTTGGC      | 416 |
| SL    | AAAGCAAGTTTGCTAAAATTTTAAAGATCGTGATTATACCGATAAAAAGTCTATTGAAA CTTAC-GAAAAATACTGTTTGGC      | 409 |
| LS    | AAAGCAAGTTTGCTAAAATTTTACAGATCATGATTATGCCGATAAAGATGATTGAAA CTTAC-GAAAAATACTGTTTGGC        | 416 |
| ***** |  |     |
| HC    | CCAA TTGGTCGACAAACACAACGACTGCTACGTGGC GGTATGCGTGTGAAGCCGGGATTGGAACCGCAGCAACC             | 493 |
| T3    | CCAA TTGGTCGACAAACACAACGACTGCTACGTGGC ----GGTATGCGTGTGAAGCCGGGATTGGAACCGCAGCAACC         | 493 |
| AC    | CCAA TTGGTCGACGAACGCAACGACTACTACGTGGC-----GGTATGCGTGTGAAGCCGGGATTGGAACCGCAGCAACC         | 493 |
| HA    | CCAA-TTGGTCGACGAACGCAACGACTACTACGTGGC-----GGTATGCGTGTGAAGCCGGGATTGGAACCGCAGCAACC         | 493 |
| SL    | CAAATTTGGTCGACGAACGCAACGACTACTACGTGGC-----GGTATGCGTGTGAAGCCGGGATTGGAACCGCAGCAACC         | 487 |
| LS    | CAAATTTGGTCGACGAACGCAACGACTACTACGTGGCCTTGGCGGTATCAGTATGGAAGCCGAGCTTGGGAACGCAACGCTTCC     | 496 |
| ***** |  |     |
| HC    | AAGTGTATCTTTTGGATACAAACCGATTGGTAACAAAGTATTGTGCGGTTTGGTCAACGAAATTAACGACACGGGACTTTACG      | 577 |
| T3    | AAGTGTATCTTTTGGATACAAACCGATTGGTAACAAAGTATTGTGCGGTTTGGTCAACGAAATTAACGACACGGGACTTTACG      | 577 |
| AC    | AAGTGTATCTTTTGGATACAAACCGATTGGTAACAAAGTATTGTGCGGTTTGGTCAACGAAATTAACGACACGGGACTTTACG      | 577 |
| HA    | AAGTGTATCTTTTGGATACAAACCGATTGGTAACAAAGTATTGTGCGGTTTGGTCAACGAAATTAACGACACGGGACTTTACG      | 577 |
| SL    | AAGTGTATCTTTTGGATACAAACCGATTGGTAACAAAGTATTGTGCGGTTTGGTCAACGAAATTAACGACACGGGACTTTACG      | 571 |
| LS    | AAGTGTATCTTTTGGATACAAACCGATTGGTAACAAAGTATTGTGCGGTTTGGTCAACGAAATTAACGACACGGGACTTTACG      | 580 |
| ***** |  |     |
| HC    | AGTACGAGCTCTAGCTTACGTGGACAGTGTGGAGTTTGTATGGCAACAAATTTGAAGAGTTTGTACAAAAATTAATATTGCGGT     | 661 |
| T3    | AGTACGAGCTCTAGCTTACGTGGACAGTGTGGAGTTTGTATGGCAACAAATTTGAAGAGTTTGTACAAAAATTAATATTGCGGT     | 661 |
| AC    | AGTACGAGCTCTAGCTTACGTGGACAGTGTGGAGTTTGTATGGCAACAAATTTGAAGAGTTTGTACAAAAATTAATATTGCGGT     | 661 |
| HA    | GGTACGCGCTCTAGCTTACGTGGACAGTGTGGAGTTTGTATGGCAACAAATTTGAAGAGTTTGTACAAAAATTAATATTGCGGT     | 661 |
| SL    | AGTACGAGCTCTAGCTTACGTGGACAGTGTGGAGTTTGTATGGCAACAAATTTGAAGAGTTTGTACAAAAATTAATATTGCGGT     | 655 |
| LS    | ACGACGAGCTCTAGCTTACGTGGACAGTGTGGAGTTTGTATGGCAACAAATTTGAAGAGTTTGTACAAAAATTAATATTGCGGT     | 661 |
| ***** |  |     |
| HC    | CGT-CG-TTCAACGATTTCGAAAAGGTTTATATTACAACGAAGCGTCGAAAAACAAAACATGATCTACAAGGCTTTGGAGT        | 742 |
| T3    | CGT-CG-TTCAACGATTTCGAAAAGGTTTATATTACAACGAAGCGTCGAAAAACAAAACATGATCTACAAGGCTTTGGAGT        | 742 |
| AC    | CGT-CG-TTCAAAAATTCGAAAAGGTTTATATTACAACGAAGCGTCGAAAAACAAAACATGATCTACAAGGCTTTAGAGT         | 742 |
| HA    | CGT-CG-CTCCTGATTTCGAAAAGGTTTATATTGCTGGCGAAGCGCGGCTCCAGCGCATGATCTACAAGGCTTTAGAGT          | 742 |
| SL    | CGTTGCTGTTTCAAAATTCGAAAAGGTTTATATTACAACGAAGCGTCGAAAAACAAAACATGATCTACAAGGCTTTAGAGT        | 733 |
| LS    | CGTGTGCTTCAAAAATTCGAAAACCTTTTGTCTTGGGCGAAGCGTCGAAAAACAAAACATGATCTACAAGGCTTTAGAGT         | 745 |
| ***** |  |     |
| HC    | TTACTACAGAATCGAGTGGGTCAAATCCAACAAGTTTAAATGGAAAAATTTTGTAAACGGTTTATTTATGATAAAAAATCAA       | 826 |
| T3    | TTACTACAGAATCGAGTGGGTCAAATCCAACAAGTTTAAATGGAAAAATTTTGTAAACGGTTTATTTATGATAAAAAATCAA       | 826 |
| AC    | TTACTACAGAATCGAGTGGGTCAAATCCAACAAGTTTAAATGGAAAAATTTTGTAAACGGTTTATTTATGATAAAAAATCAA       | 826 |
| HA    | TTACTACAGAATCGAGTGGGTCAAATCCAACAAGTTTAAATGGAAAAATTTTGTAAACGGTTTATTTATGATAAAAAATCAA       | 826 |
| SL    | TTACTACAGAATCGAGTGGGTCAAATCCAACAAGTTTAAATGGAAAAATTTTGTAAACGGTTTATTTATGATAAAAAATCAA       | 817 |
| LS    | TTACTACAGAATCGAGTGGGTCAAATCCAACAAGTTTAAATGGAAAAATTTTGTAAACGGTTTATTTATGATAAAAAATCAA       | 829 |
| ***** |  |     |
| HC    | AAGCGTTGATGTTAAATTCGCAAAATGTAACCTAGTACACTCAACAAAAATGTAATATTAGACATGATT-----AAATAA         | 900 |
| T3    | AAGCGTTGATGTTAAATTCGCAAAATGTAACCTAGTACACTCAACAAAAATGTAATATTAGACATGATT-----AAATAA         | 900 |
| AC    | AAGCGTTGATGTTAAATTCGCAAAATGTAACCTAGTACACTCAACAAAAATGTAATATTAGACATGATT-----AAATAA         | 900 |
| HA    | AAGTGGTGTATGTTAAATTCGCAAAATGTAACCTAGTACACTCAACAAAAATGTAATATTAGACATGATT-----AAATAA        | 900 |
| SL    | AAGTGTGATGTTAAATTCGCAAAATGTAACCTAGTACACTCAACAAAAATGTAATATTAGACATGATT-----AAATAA          | 891 |
| LS    | AAGTGTGATGTTAAATTCGCAAAATGTAACCTAGTACACTCAACAAAAATGTTATATTAGACATGATT-----AAATAA          | 909 |
| ***** |  |     |

图 4 杆状病毒 p35 基因核苷酸序列同源性比较

Fig. 4 Homology analysis on the p35 nuclear acid sequence of baculovirus

HC、T3、AC、HA、SL、LS: HycuNPV p35、BomoNPV T3 p35、AucaNPV p35、HearNPV p35、SpliNPV p35、LeseNPV p35 基因核苷酸序列  
 HC, T3, AC, HA, SL, LS: Nuclear acid sequence of HycuNPV p35, BomoNPV T3 p35, AucaNPV p35, HearNPV p35, SpliNPV p35, LeseNPV p35

|    |   |     |
|----|---|-----|
| HC | MCVIFPVEIDVDSQTVIRDCCHVDEQTREL-VYINKIMNTQLTKPVLMMFNISGPIRSVTRKNNDLRDRIKSKVDEQFDQLEREY           | 82  |
| T3 | MCVIFPVEIDVDSQTVIRDCCHVDEQTREL-VYINKIMNTQLTKPVLMMFNISGPIRSVTRKNNDLRDRIKSKVDEQFDQLEREY           | 82  |
| AC | MCVIFPVEIDVDSQTIIRDCQVDKQKTREL-VYINKIMNTQLTKPVLMMFNISGPIRSVTRKNNDLRDRIKSKVDEQFDQLERDY           | 82  |
| HA | MCVIFPVEIDVDSQTVIRDCQVDKQKTREL-VYINKIMNTQLTKPVLMMFNISGPIRSVTRKNNDLRDRIKSKVDEQFDQLERDY           | 82  |
| SL | MCVIFRGRNRRVQTIIEIVRWTT-TRELCTYRY---EPQLTKPVLMMFNISGPIRTVTRKNNDLRDRIKSKVDEQFDQLINLERDY          | 79  |
| LS | MCVIFPVEVHVSQPIIRDCQVDKQKTREL-VYINKITNTQPTKPVLMFNISGPIRSVTRKNKFKRDRIKSKEIHQFDPLQRDW             | 82  |
|    | ***** . . . . . ***** . . . . . ***** . . . . . ***** . . . . . ***** . . . . . ***** . . . . . |     |
| HC | SDKIDGFHDNTIQYFKDEHYSVSCQNGSVLKSFKAKILKSRDYTDKKSIEITYEKYCL-PQLVDKHNDXYVA--VCVLKPGFENG           | 162 |
| T3 | SDKIDGFHDNTIQYFKDEHYSVSCQNGSVLKSFKAKILKSHDYTDKKSIEITYEKYCL-PQLVDKHNDXYVA--VCVLKPGFENG           | 162 |
| AC | SDQMDFHDSIKYFKDEHYSVSCQNGSVLKSFKAKILKSHDYTDKKSIEITYEKYCL-PKLVDERNYDYVA--VCVLKPGFENG             | 162 |
| HA | SDQLVGFQVSIKYFQDAQWESQIGSVLKSFKAKILKSHDYTDKKSIEITYEKYCL-PKLVDERNYDYVA--VCVLKPGFENG              | 162 |
| SL | SDQMDFHDSIKYFKDEHYSVSCQNGSVLKSFKAKILKSDQYTDKKSIEVLLRNTVCPNLVDERNYDYVA--VCVLKPGFENG              | 160 |
| LS | SDQMDFHDSIKYFKDEHYSVSCQNGSVLKSFKAKILKSHDYADKKIEAYGKFFL-PKT-CHRSGFYVALAVSVWKPGLNS                | 163 |
|    | ***** . . . . . ***** . . . . . ***** . . . . . ***** . . . . . ***** . . . . . ***** . . . . . |     |
| HC | SNQVLSFEYNPIGNKVIVPFAHEINDTGLYEYDVLAAYVDSVEFDGKQFEFVQKLIIPSSFNDSKVLVLYNEASKNKNMITYKA            | 216 |
| T3 | SNQVLSFEYNPIGNKVIVPFAHEINDTGLYEYDVLAAYVDSVEFDGKQFEFVQKLIIPSSFNDSKVLVLYNEASKNKNMITYKA            | 216 |
| AC | SNQVLSFEYNPIGNKVIVPFAHEINDTGLYEYDVLAAYVDSVQFDGQFEFVQSLIIPSSFNDSKVLVLYNEASKNKNMITYKA             | 216 |
| HA | SNQVLSFEYNPIGNKVIVPFAHEINDTGLYEYDVLAAYVDSVQFDGQFEFVQSLIIPSSFNDSKVLVLYNEASKNKNMITYKA             | 216 |
| SL | SNQVLSFEYNPIGNKVIVPFAHEINDTGLYEYDVLAAYVDSVQFDGQFEFVQSLIIPSSFNDSKVLVLYNEASKNKNMITYKA             | 214 |
| LS | SNQVLSFEYNPICVYKIVPFGHIEIGVTGLDDBAAKQDSVEEBAKAEKNRVQSLMPCCFKNSENLSSWGEASKNKSMMWNP               | 217 |
|    | * ***** * ***** . . . . . ***** . . . . . ***** . . . . . ***** . . . . . ***** . . . . .       |     |
| HC | LEFTTESSWVKSNNKFNWKIFCNGFIYDKSKALYVKLHNVTSLNKNVILDMI  | 299 |
| T3 | LEFTTESSWVKSNNKFNWKIFCNGFIYDKSKALYVKLHNVTSLNKNVILDMI  | 299 |
| AC | LEFTTESSWVKSNNKFNWKIFCNGFIYDKSKALYVKLHNVTSLNKNVILNTI  | 299 |
| HA | LEFTTESSWVKSNNKFNWKIFCNGFIYDKSKALYVKLHNVTSLNKNVILNTI  | 299 |
| SL | LEFTTESSWVKSNNKFNWKIFCNGFIYDKSKALYVKLHNVTSLNKNVILNTI  | 296 |
| LS | KEFTTECRWPKSQNNKFNWKIFCNGFIYDKSKALYVKLHNVTSLNKNVILNTIFLM  | 302 |
|    | ***** . . . . . ***** . . . . . ***** . . . . . ***** . . . . . ***** . . . . . ***** . . . . . |     |

图5 杆状病毒 *p35* 蛋白的氨基酸同源序列分析Fig. 5 Homology analysis of the *p35* amino acid sequence of baculovirus

HC、T3、AC、HA、SL、LS: HycuNPV *p35*、BomoNPV T3 *p35*、AucaNPV *p35*、HearNPV *p35*、SpliNPV *p35*、LeseNPV *p35* 蛋白氨基酸序列

HC, T3, AC, HA, SL, LS: Amino acid sequence of HycuNPV *p35*, BomoNPV T3 *p35*, AucaNPV *p35*, HearNPV *p35*, SpliNPV *p35*, LeseNPV *p35*

### 3 讨论

杆状病毒中存在两类不同的细胞凋亡抑制基因，一种是编码分子量为 35 kD 蛋白的 *p35* 基因，另一种是编码细胞凋亡抑制蛋白的 *iap* 基因，研究表明这两种基因分别作用于细胞凋亡过程的不同阶段，阻抑细胞凋亡的机制也存在差别 (Manji *et al.*, 1997)。虽然 *p35* 基因在杆状病毒中具有一定的保守性，但并非所有杆状病毒均具有 *p35* 基因，在 GenBank 所登录的完整 NPV 基因组中，舞毒蛾核型多角体病毒 (LydiNPV, *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus, GenBank, AF081810)、黄杉毒蛾核型多角体病毒 (OrpsNPV, *Orgyia pseudotsuyata* nucleopolyhedrovirus, GenBank, U75930)、甜菜夜蛾核型多角体病毒 (SpexNPV, *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus, GenBank, NC-002169)、苹淡褐卷蛾核型多角体病毒 (EppoNPV, *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus, GenBank, NC-003083)、小菜蛾颗粒体病毒 (PlxyGV, *Plutella xylostella* granulovirus, GenBank, AF270937)、八字地老虎颗粒体病毒 (XecnGV, *Xestia c-nigrum* granulovirus, GenBank, AF162221) 的基因组中就未发现该基因的同源序

列，而在这些核型多角体病毒中，存在着与 *p35* 基因功能相似的编码细胞凋亡抑制蛋白 *iap* 基因，因而可能在进化过程中，这些 NPV 的 *p35* 基因无需保留。

带有功能缺失的 *p35* 基因的 AucaNPV 突变系接种 SF-21 细胞后 12~24 h 之间引起大量细胞凋亡，而感染 TN-368 细胞则不然 (Hershberger *et al.*, 1992)；缺失 *p35* 基因的 BomoNPV T3 感染 BmN 细胞时，可诱发类似细胞凋亡的现象，但仍有相当数量的细胞能充分支持病毒的复制 (Kamita *et al.*, 1993)。HycuNPV *p35* 基因与 BomoNPV T3 *p35* 基因在核苷酸水平上有 99.9% 的同源性，在氨基酸水平上的同源性达 99.7%，且 *p35* 发挥功能必需的 C-末端 12 个氨基酸残基完全同源，病毒诱导的宿主 Caspase 在 *p35* 蛋白上的切割位点 D<sup>87</sup>-G<sup>88</sup> 也保守 (Bertin *et al.*, 1996)，*p35* 蛋白抑制细胞凋亡的活力与 *p35* 蛋白的切割效率有关 (Morishima *et al.*, 1998)，鉴于本测序样本 HycuNPV *p35* 基因与 BomoNPV T3 *p35* 基因在核苷酸水平的差异导致的氨基酸差异可能对 *p35* 蛋白的功能并非至关重要，推测 HycuNPV *p35* 蛋白的功能及抑制细胞凋亡的能力与 BomoNPV T3 *p35* 蛋白的相似。



## 参 考 文 献 (References)

- Bertin J, Mendrysa S M, Lacount D J, Gaur S, Krebs J F, Armstrong R C, Tomaselli K J, Friesen P D, 1996. Apoptotic suppression by baculovirus *p35* involves cleavage by and inhibition of a virus-induced CED-3/ICE-like protease. *J. Virol.*, 70: 6 251 – 6 259.
- Cao G L, Xue R Y, Zhu Y X, *et al.*, 2001. Analysis and expression of *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus *sod* gene. *Acta Microbiologica Sinica*, 41 (2): 173 – 180. [曹广力, 薛仁宇, 朱越雄等, 2001. 美国白蛾核型多角体病毒超氧化物歧化酶基因的序列分析和表达. 微生物学报, 41 (2): 173 – 180]
- Clem R J, Fechheimer M, Miller L K, 1991. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cell. *Science*, 254: 1 388 – 1 390.
- Crook N E, Clem R J, Miller L K, 1993. An apoptotic genes of baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol.*, 67: 2 168 – 2 174.
- Gong C L, Kobayasi J, Miyajima N, *et al.*, 1998. Nucleotide sequence analysis of the HcNPV cysteine protease gene. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 30 (3): 307 – 310. [贡成良, 小林淳, 宫岛成寿等, 1998. HcNPV 半胱氨酸蛋白酶基因的核苷酸序列研究. 生物化学与生物物理学报, 30 (3): 307 – 310]
- Gong C L, Kobayasi J, Miyajima N, *et al.*, 1999. Sequence analysis of *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus chitinase gene. *Chinese J. Virol.*, 15 (3): 260 – 269. [贡成良, 小林淳, 宫岛成寿等, 1999. 美国白蛾核型多角体病毒几丁质酶基因核苷酸序列研究. 病毒学报, 15 (3): 260 – 269]
- Hershberger P A, Dickson J A, Friesen P D, 1992. Site-specific mutagenesis of the 35-kilodalton protein gene encoded by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: cell line-specific effects on virus replication. *J. Virol.*, 66: 5 525 – 5 533.
- Kamita S G, Majima K, Maeda S, 1993. Identification and characterization of the *p35* gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis. *J. Virol.*, 67: 455 – 463.
- Manji G A, Hozak R R, Lacount D J, Friesen P D, 1997. Baculovirus inhibitor of apoptosis functions at or upstream of the apoptotic suppressor *p35* to prevent programmed cell death. *J. Virol.*, 71: 4 509 – 4 616.
- Morishima N, Okano K, Shibata T, Maeda S, 1998. Homologous *p35* proteins of baculoviruses show distinctive anti-apoptotic activities which correlate with the apoptosis-inducing activity of each virus. *FEBS Lett.*, 427: 144 – 148.